



TITLE:

# 分化中の木部細胞膜内表面の電子顕微鏡観察法

AUTHOR(S):

今村, 祐嗣; 佐伯, 浩; 原田, 浩

---

CITATION:

今村, 祐嗣 ...[et al]. 分化中の木部細胞膜内表面の電子顕微鏡観察法. 京都大学農学部演習林報告 1972, 43: 303-308

ISSUE DATE:

1972-03-15

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/191506>

RIGHT:

# 分化中の木部細胞膜内表面の電子顕微鏡観察法

今村祐嗣・佐伯 浩・原田 浩

## Technique for Electron Microscopy of the Inner Surface of Cell Wall in Differentiating Xylem

Yuji IMAMURA, Hiroshi SAIKI and Hiroshi HARADA

### 目 次

要 旨 .....	303	3. 結果および考察 .....	304
1. はじめに .....	303	引用文献 .....	306
2. 材料と方法 .....	304	Résumé .....	306

### 要 旨

分化中の樹木木部細胞に原形質分離処理および凍結乾燥法を適用して、形成段階の細胞膜の内表面を電子顕微鏡で観察する方法を試みた。樹幹より分化帯を含む木材ブロックを切り出し、0.8 M のショ糖の高張液で原形質分離をおこさせた。ついでそれより凍結切片を得、凍結乾燥してカーボン一段レプリカを作製した。この方法を分化中のアカマツ仮道管の観察に適用した結果、細胞内容物の付着のない、また乾燥に伴うアーティファクトの少ない仮道管膜内表面のレプリカ像を得ることができた。したがってこの方法は細胞膜の形成過程を追跡することによって木材細胞の膜層構造を研究する上に有用である。

### 1. は じ め に

木材細胞膜の構造とくに膜層構成、ミクロフィブリルの配向については、電子顕微鏡に種々の試料作製テクニックを利用して多くの知見が得られてきた。それらの知見からみても木材細胞膜はきわめて複雑な構造であり、とくに二次膜に特徴的な交差構造、移行構造などの観察は一般には困難であった。最近一つの仮道管膜上にさまざまなラメラを露出させ、それをレプリカ観察するというテクニックが開発された<sup>1)</sup>が、この研究をも含め、いままでの膜構造に関する研究はおもに成熟した細胞について行なわれたものであった。

木材細胞膜は樹木の形成層で細胞が分裂したのち  $P$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  が順次形成されて完成する。したがってそのような膜形成過程を細胞膜の内表面について追跡してゆけば、種々の形成段階にある細胞膜をとらえることが可能であると思われる。またこれに関連した WARDROP と HARADA<sup>2)</sup>の実験結果は興味深い。すなわち *Eucalyptus regnans*, *Pinus radiata* などの幼樹に  $^{14}\text{CO}_2$  を与え、その後解離した仮道管や木繊維をオートラジオグラフィーおよび偏光顕微鏡でしらべた。その結果二次膜では  $S_1$ ,  $S_2$  の肥厚は一個の細胞の中央付近で始まり、細胞の先端の方向へ順次進んで

ゆくことがわかったというものである。この研究結果は一つの分化中の細胞の膜上に配向の異なるミクロフィブリルよりなるラメラを順次追跡する可能性を示唆するものである。

しかしながら形成段階にある細胞膜の内表面を、電子顕微鏡によりレプリカ観察するにはいくつかの障害がある。一つは分化中の細胞には細胞内容物が存在し、これが新生された細胞膜上に付着して膜層観察を困難にすることである。他の一つはレプリカ観察にはサンプルを乾燥させる必要があるが、形成段階の細胞膜は木化度が低いから、通常の乾燥方法では試片がカールしたりコラプスを起して細胞膜に変形を生じやすいということである。

この報告は、このような二つの障害をできるだけ少なくするために、高張液浸漬処理と凍結乾燥法を適用して分化中の細胞の細胞膜内表面の観察を試みたものである。

この研究の実施上、試料を提供していただいた京都大学農学部付属演習林の方々に、また実験方法について適切な助言と示唆を与えられ元同農学部林産工学科助手谷口諫氏（現在三菱油化株式会社樹脂研究所勤務）、さらに研究全般にわたり援助を与えられた木材構造学研究室の各位に深く感謝致します。なおこの報告の一部は第20回日本木材学会大会（昭和45年9月・東京）において口頭発表した。

## 2. 材 料 と 方 法

### 1. 材 料

アカマツ (*Pinus densiflora* SIEB. et Zucc.) 京都大学農学部 付属演習林 上賀茂試験地植栽。約40年生。

立木の胸高部位より分化活動中の5月～7月にかけ分化帯をふくむ約1×1×1.5 cmの木材ブロックを切り出した。

### 2. 方 法

原形質分離を生じさせる目的で木材ブロックを採取後直ちに0.8 Mのショ糖の高張液に浸漬し2日間冷所に置いたのち、ドライアイス・エタノール中に入れて瞬間凍結し供試まで凍結保存した。ドライアイス上でこの凍結ブロックより小さいブロックをトリミングし、フリーザーの付いた凍結ミクロトームで約30～40μ厚の柁目切片を作製した。この柁目切片を水中で軽く洗ったのちスライドガラス上に再び凍結付着せしめ、そのまま凍結乾燥装置（ドライアイス・エタノール使用）中で乾燥した。乾燥した切片はシリカゲルの入った容器中でレプリカ作製まで保存した。

この柁目切片から、一段レプリカ (Pt・Pd シヤドウイングとカーボン蒸着) をつくって電子顕微鏡で観察した。なお木材切片を溶解する際の裏打ちには、CÔTÉ<sup>3)</sup> ら、Tsoumis<sup>4)</sup> に準じポリスチレンを用いた。

## 3. 結 果 お よ び 考 察

### 1. 原形質分離処理について

Fig. 1, 2 はともに形成段階にあるアカマツ仮道管膜の内表面を示し、 $S_3$ を形成中のものである。Fig. 1 は試料に原形質分離処理を施さず立木より切り出したのち直ちに凍結し、切片作製後水洗、凍結乾燥してレプリカを得、観察したものである。一方 Fig. 2 はこの実験方法にしたがい試料を作製し観察したものである。Fig. 1 においては細胞内容物が仮道管膜の大部分をおおい、膜

のミクロフィブリル構造は内容物のすき間からその一部が観察できるにすぎない。しかし Fig. 2 にしめすように原形質分離処理をした試片では、細胞内容物の仮道管膜への付着はほとんど無く、形成途上の仮道管膜のフィブリル構造を明瞭にとらえることができる。原形質分離処理をおこなわなくても切片作製後十分水洗すればある程度の細胞内容物は流失するが、同時にミクロフィブリルの配向が乱れる恐れがあり、膜層観察には適しない。

立木より試料を切り出したのちそのまま凍結したブロックと、0.8 M の高張液で処理したブロックとからそれぞれ小片をとり、これを  $\text{KMnO}_4$  で固定・染色しエポキシ樹脂に包埋したのち、その超薄切片を電子顕微鏡で観察したものを Fig. 3 に掲げる。(a)は原形質分離処理をしなかったもの、(b)は処理したものである。分化中の仮道管であるから、生育時には仮道管膜に沿って原形質が存在している。(a)では原形質が仮道管膜に沿って付着しているが、(b)では仮道管膜より剝離しているのがしめされている。これより明らかなようにこの濃度の高張液処理により、原形質が細胞膜より分離していることがわかる。

高張液の濃度を 0.8 M としたことに關しては明確な根拠はないが、ショ糖 0.8 M の水溶液の浸透圧は 20.91 気圧であり、一方高等植物の細胞内部の浸透圧は 10 気圧付近の値をとるとされている。そこで余裕を見込んで適宜定めたものであるが、Fig. 2, 3 また以下の写真にしめすように、この濃度の高張液で原形質分離をおこさせる効果は十分である。

## 2. 凍結乾燥について

パルプなどの表面をレプリカ観察する際、試料を風乾で調整すると、繊維表面に大きなしわ、収縮が生じることはよく知られている。木材においても木化度の低い未成熟細胞よりなる分化帯を含む切片は、著しい収縮によってしわやコラップスを生じてしまう。このような収縮は、細胞膜のミセル間隙に存在する水が蒸散すると、その間隙を埋めるようにミセル相互が近づきそのために生じるとされている<sup>5)</sup>。凍結乾燥は、このミセル間隙の水をそのまま小さな結晶として氷結させ、この小さい氷の結晶を昇華せしめ水の存在した状態のまま乾燥させるというものである。

この凍結乾燥により分化中の未成熟細胞を含む切片を乾燥させ、以下の観察例にしめすようにコラップス・しわのほとんど無い供試片を得ることができる。しかし凍結乾燥中の実験条件にもよるが、仮道管膜内表面のミクロフィブリルは水の存在していた生の状態そのまま保持されているとはいきれない。これは、凍結乾燥法といえども急速に凍結せしめない大きな氷粒を生じたり、また試料にある程度の収縮亀裂が生じる場合があるとされている<sup>6)</sup> ことに通じる。例えば Fig. 2, 6 で、仮道管膜内表面上の新生されたミクロフィブリルはいくつか集合して bundle 状として観察される。そこでこのような乾燥に伴うアーティファクトをより少なくとどめようとするなら、NORBERG<sup>7)</sup> が指摘しているように蒸着装置中に組み入れた台上で切片表面だけ水を昇華させ、直接レプリカ膜を作製する方法が適當であるかもしれない。しかしながら、内表面上のミクロフィブリルがいくつか集合しても、それはそのミクロフィブリルの配向に沿って並ぶことに変わりはない。このようなアーティファクトに伴う現象は少なければそれだけよいが、この研究の主目的は膜層構造の解明にあるので、ここに用いた方法で十分であると思われる。

## 3. 2・3の観察例

Fig. 4 は形成のごく若い段階、仮道管が軸方向、半径方向に伸長している際の仮道管膜内表面である。ミクロフィブリルはランダムであるが比較的軸方向に並んでいる。Fig. 5 は Fig. 4 にしめた仮道管よりさらに形成段階のすすんだ仮道管膜の内表面である。この段階では、仮道管は最終的な長さで径とに達している。ミクロフィブリルは Fig. 4 と同様ランダムであるが、細胞

軸に直角方向に波状を描いて並んでいる。この Fig. 4, 5 は WARDROP と HARADA<sup>2)</sup> により指摘された一次膜における outer surface と inner surface にそれぞれ相当すると思われる。

$S_1$  の構造については横巻き構造をとるという考え方<sup>8)</sup>, あるいはラメラが交差しているという考え方<sup>9)</sup> といろいろ言われているが判然としていない。これは従来の観察方法ではそのような  $S_1$  の構造を一般的に現わすことが困難であるためと思われる。そこでこの実験の観察では Fig. 6 のように新しく形成されたラメラは、それまで形成・堆積したラメラと配向が交差しているのがみられる。なおこの新しく形成されたラメラのマイクロフィブリルの間隔が比較的広くあいている。これは LARSON<sup>10)</sup> により推定されているように  $S_1$  では膜形成の速度が速く、ために堆積したマイクロフィブリルの Packing も比較的ゆるやかで、その間隔も広いということに起因すると思われる。

このように、いままでの成熟細胞のレプリカ観察ではとらえることの困難であった膜層を、この方法を利用して容易に観察することができる。したがって形成途上の木材細胞膜の内表面を形成段階にしたがい追跡観察するこの方法は、膜層構成研究の有力な手段であると思われる。

## 引用文献

- 1) DUNNING, C. E.: The structure of Longleaf-Pine Latewood, 1. Cell-Wall Morphology and the Effect of Alkaline Extraction, Tappi **52** (7), 1326-1335, (1969)
- 2) WARDROP, A. B. and HARADA, H.: The Formation and Structure of the Cell Wall in Fibres and Tracheids, J. Exp. Bot. **16**, (47) 356-371, (1965)
- 3) CÔTÉ, W. A. JR., KORAN, Z. and DAY, A. C.: Replica Techniques for Electron Microscopy of Wood and Paper, Tappi **47** (8), 477-484, (1964)
- 4) TSOUKIS, G.: Preparation of Preshadowed Carbon Replicas for Electron Microscopic Investigation of Wood, Holzforschung **18** (6), 177-179, (1964)
- 5) 梶田茂編: 木材工学, 118-120, (1961)
- 6) 根井外喜男: 電子顕微鏡による生物料試の凍結及び乾燥の研究, J. Electron Microscopy **19** (1), 6-11, (1970)
- 7) NORBERG, P. H.: A Method for Electron Microscopy Observations of Wet Wood Fiber Surfaces, Svensk Papperstidning årg **71**, 869-871, (1968)
- 8) KERR, T. and BAILEY, I. W.: The cambium and its derivative Tissues, No. X, J. Arnold Arboretum **15**, 327-349, (1934)
- 9) WARDROP, A. B.: The Organization and Properties of the Outer Layer of the Secondary Wall in Conifer Tracheids, Holzforschung **11** (4), 102-110, (1957)
- 10) LARSON, P. R.: Incorporation of  $^{14}\text{C}$  in the Developing Walls of *Pinus resinosa* Tracheids (Earlywood and Latewood), Holzforschung **23** (1), 17-26, (1969)

## Résumé

A preparation method for electron microscopic studies of the inner surface of the cell wall in the differentiating cell is described. Two treatments are performed in the preparation of the material for replication: 1. the removal of the cytoplasm by plasmolysis and 2. the application of a freeze-drying method to aid the preservation of the newly formed wall in native condition.

The block containing the xylem differentiating zone is first taken from the tree and then immersed in the high osmotic agent of saccharose of a concentration of 0.8 Mol/l. The radial longitudinal sections for replication are sliced from that block in frozen condition and freeze-dried after rinsing in the distilled water.

Through the application of this method to the differentiating xylem of *Pinus densiflora* S.

et. Z., it is possible to detect the innermost surface of the tracheid wall which is detached from the cytoplasm and free of the artificial modifications induced by drying (Figs. 2, 4, 5 and 6). This method makes it useful to observe the organization of the wood cell wall in the process of its formation.

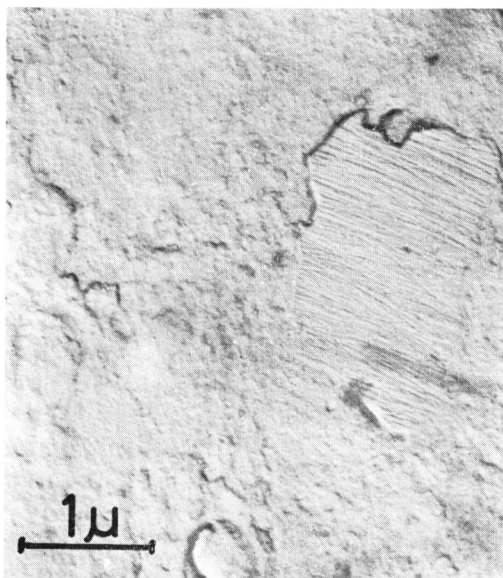


Fig. 1. A direct carbon replica of the radial inner surface of the  $S_3$ -layer in a differentiating tracheid showing the adhered protoplasm on the surface. Note that the sample is non-treated and freeze-dried.

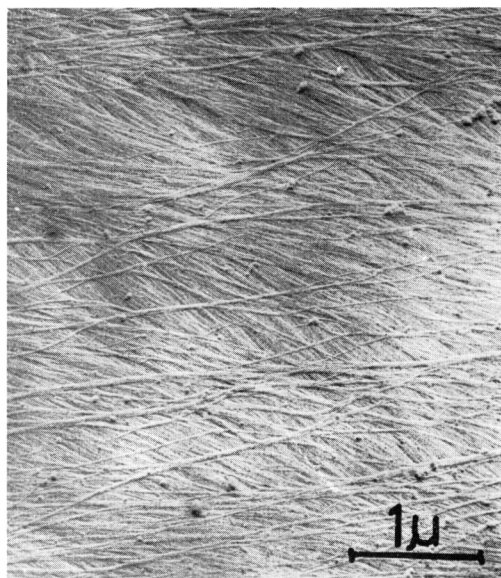


Fig. 2. A direct carbon replica of the radial inner surface of the  $S_3$ -layer in a differentiating tracheid showing newly deposited micro-fibrils. Note that the sample is treated with high pertonic agent and freeze-dried.

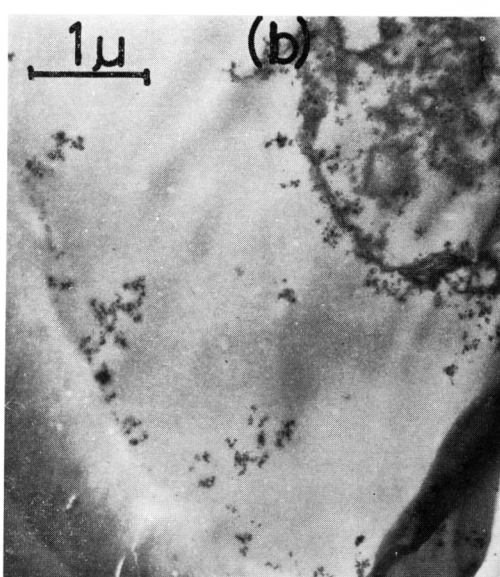
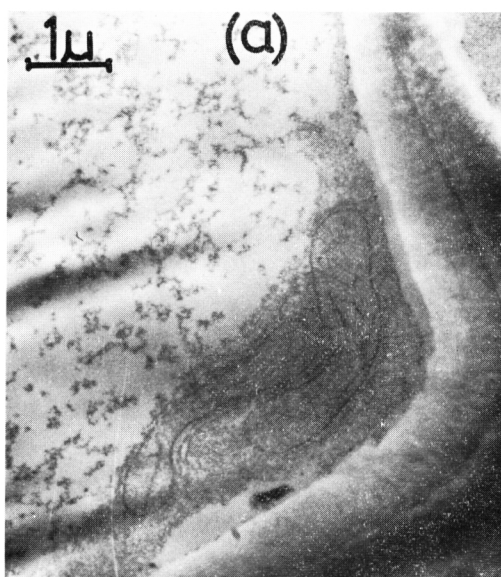


Fig. 3. Cross sections of the differentiating tracheids stained with  $KMnO_4$ . Sample of (a) is non-treated and that of (b) is treated with high pertonic agent.

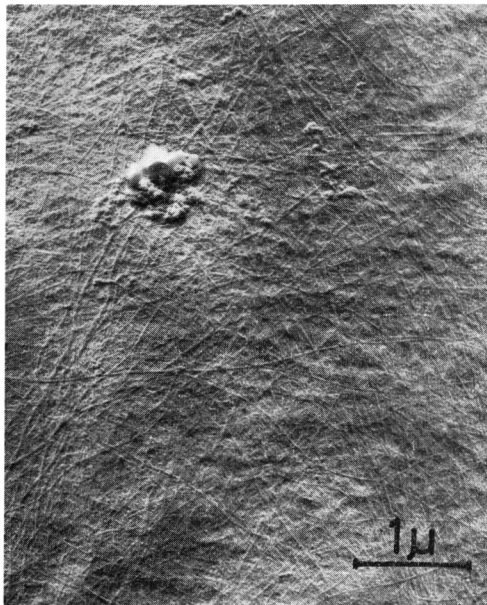


Fig. 4. A direct carbon replica of the radial inner surface in a differentiating tracheid showing the microfibrillar orientation of the outer surface of the primary wall ( $P_0$ ).

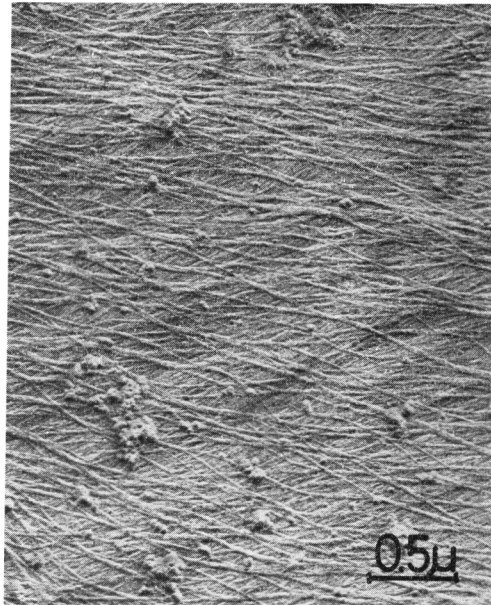


Fig. 6. Similar to Fig. 4, showing the microfibrillar orientation of the newly deposited lamella crossing with that of the underlying lamella in the  $S_1$  layer.

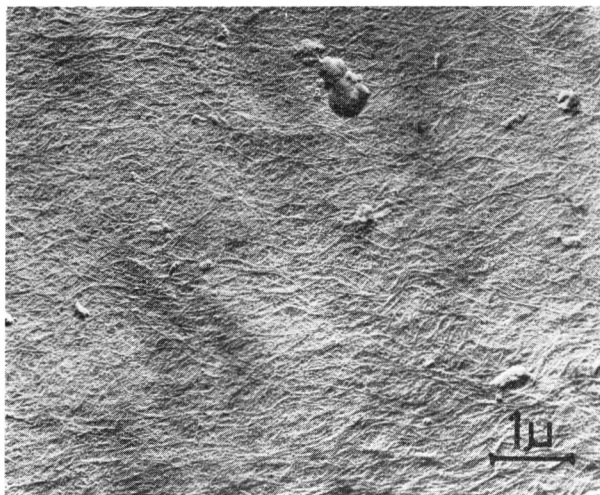


Fig. 5. Similar to Fig. 4, showing the microfibrillar orientation of the inner surface of the primary wall ( $P_1$ ).